

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 5 :  A23J 1/16, 1/12, 1/14	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/06741  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1993 (15.04.93)
---	----	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02313  (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Oktober 1992 (08.10.92)  (30) Prioritätsdaten: P 41 33 538.4 10. Oktober 1991 (10.10.91) DE  (71)(72) Anmelder und Erfinder: NEUMÜLLER, Waldemar [DE/DE]; Wilhelm-Baum-Weg 29, D-3400 Göttingen (DE).  (74) Anwalt: REHBERG, Elmar; Am Kirschberge 22, D-3400 Göttingen (DE).  (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, PL, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>
---	--

(54) Title: METHOD OF EXTRACTING PROTEINS UTILIZABLE IN FOODSTUFFS FROM A PROTEIN-CONTAINING SUBSTANCE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON LEBENSMITTELFAHIGEN PROTEINEN AUS EINER PROTEINHALTIGEN SUBSTANZ

(57) Abstract

In the method described, a protein-containing substance is first taken up in an alkaline solvent to give a solution. Insoluble constituents of the substance are separated off, the solution is neutralized and desalinated, and then the proteins contained in the solution are concentrated. The decomposition of the protein-containing substance is carried out at room temperature using homogenization equipment. The heat dissipated into the protein-containing substance during homogenization is simultaneously removed. The pH of the alkaline solvent during the decomposition is over 11.5 and/or decomposition is carried out in the presence of a detergent, in particular sodium dodecyl sulphate (SDS).

(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Gewinnung von lebensmittelfähigen Proteinen aus einer proteinhaltigen Substanz wird eine Lösung durch Aufschluß der proteinhaltigen Substanz in einem alkalischen Lösungsmittel gewonnen. Unlösliche Bestandteile der Substanz werden von der Lösung abgetrennt. Die Lösung wird nach Neutralisation entsalzt und die in der Lösung enthaltenen Proteine aufkonzentriert. Der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz erfolgt bei Zimmertemperatur und unter Homogenisation. Die bei der Homogenisation eingebrachte Wärmeenergie wird gleichzeitig der proteinhaltigen Substanz wieder entzogen. Das alkalische Lösungsmittel weist beim Aufschluß einen pH-Wert größer als 11,5 auf und/oder der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz erfolgt unter Anwesenheit eines Detergents, insbesondere von Natriumdodecylsulfat (SDS).

AN

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Grüechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Moneaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Gewinnung von lebensmittelfähigen Proteinen aus einer proteinhaltigen Substanz

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gewinnung von lebensmittelfähigen Proteinen aus einer proteinhaltigen Substanz, wobei eine Lösung durch Aufschluß der proteinhaltigen Substanz in einem alkalischen Lösungsmittel gewonnen wird, wobei unlösliche Bestandteile der Substanz von der Lösung abgetrennt werden, wobei die Lösung nach Neutralisation entsalzt wird und wobei die in der Lösung enthaltenen Proteine aufkonzentriert und durch Trocknung isoliert werden. Bei der Stärkegewinnung aus Kartoffeln, der Mehlgewinnung aus Getreide, der Tofuherstellung und der Ölgewinnung aus verschiedenen Pflanzen fallen proteinhaltige Substanzen als Nebenprodukte an, deren Verwertung bislang nicht oder nur mit unverhältnismäßig hohem Aufwand möglich

2

ist. Bei der Stärkegewinnung aus Kartoffeln handelt es sich hierbei um denaturierte, durch Trocknung verhornte und nicht mehr dispergierbare Kartoffelprotein-Konzentrate. Bei der Mehlgewinnung fällt Gluten an, der aufgrund seiner klebrigen Konsistenz nur in wenigen Bereichen genutzt werden kann. Nebenprodukte der Tofuherstellung und der Ölgewinnung sind proteinhaltige Schrote.

Ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art ist aus dem "Journal of Food Science" (1974, Band 39, Seiten 183 - 186) bekannt. Dieser Artikel "Utilization of cottonseed whey protein concentrates produced by ultrafiltration" befaßt sich jedoch nicht mit der Problematik der Hydrolyse der Proteine und der dabei entstehenden Lysinoalanine und anderer Hydrolyseprodukte, die die Lebensmittelfähigkeit der konzentrierten Produkte erheblich beeinträchtigen.

Ein Verfahren zum Gewinnen von lebensmittelfähigen Proteinen aus einer proteinhaltigen Substanz, wobei die in einer Lösung enthaltenen Proteine aufkonzentriert und durch Trocknung isoliert werden, ist auch aus der DE-OS 28 14 922 bekannt. Dieses Verfahren dient zur Gewinnung von nativem Kartoffelprotein aus Kartoffelfruchtwasser. Das Kartoffelfruchtwasser fällt im Rahmen der Stärkegewinnung beim Zerkleinern der Kartoffeln an. Die in dem Fruchtwasser enthaltenen Kartoffelproteine werden durch Ansäuern und Erhitzen des Kartoffelfruchtwassers in Gegenwart von SO<sub>2</sub> ausgeflockt, d. h. koaguliert. Anschließend wird der nicht koagulierte Anteil des Fruchtwassers möglichst weitgehend abgefiltert und der so enthaltene Filterkuchen getrocknet. Alternativ wird die Sprühtrocknung der in einer teilweise eingeengten Kartoffelfruchtwasser-Lösung enthaltenen Proteine beschrieben. Zur Entfernung des in dem so gewonnenen Kartoffelproteins in größerem Umfang enthaltenen Glycoalkaloids Solanin wird dessen saure Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel, ausgewählt aus der Methanol, N-

Butanol und Isopropanol umfassenden Gruppe, angeregt. Dieser Extraktion sollen die ausgeflockten Kartoffelproteine unterworfen werden. Nachteilig bei dem bekannten Verfahren ist die Notwendigkeit, es direkt in den Stärkegewinnungsprozeß zu integrieren. Das anfallende Kartoffelfruchtwasser muß ob seiner großen Oxidationsempfindlichkeit sofort weiterverarbeitet werden. Schon bei der direkten Weiterverarbeitung des Kartoffelfruchtwassers wird gemäß der DE-OS 25. 00. 200 der Zusatz von Antioxydationsmitteln empfohlen. Die direkte Bindung des bekannten Verfahrens an den Stärkegewinnungsprozeß führt unter anderem dazu, daß es nur während der Kartoffelsaison durchgeführt werden kann. Für den Rest des Jahres stehen die entsprechenden Anlagen hingegen still. Das bekannte Verfahren hat sich auch aufgrund der zu seiner Durchführung notwendigen hohen Investitionskosten und des großen Verbrauchs an Chemikalien bei seiner Durchführung nicht durchsetzen können. Vielmehr wird das bei der Stärkegewinnung in dem Kartoffelfruchtwasser anfallende Kartoffelprotein ohne weitere Aufbearbeitung ausgefällt und getrocknet. Hierdurch entsteht das bekannte denaturierte, durch die Trocknung verhornte und nicht mehr dispergierbare Nebenprodukt.

Aus der DE-OS 28. 14. 922 ist ein Verfahren zur Aufbereitung von aus Kartoffelfruchtwasser ausgefällten Kartoffelproteinen bekannt. Hier werden vor dem Trocknen in den Kartoffelproteinen enthaltene Begleitstoffe, insbesondere Lipide, Geruchs- und Geschmacksstoffe, durch Extraktion mit einem polaren Lösungsmittel wie beispielsweise Wasser, Ethanol oder Methanol entfernt. Anschließend werden die Kartoffelproteine sprüh-, gleichstrom- oder trommelgetrocknet. Nachteil bei diesem Verfahren ist wiederum die Notwendigkeit, es direkt am Ort des Anfalls des Kartoffelfruchtwassers bzw. der Kartoffelproteine bei der Stärkegewinnung durchzuführen.

Bei der Tofuherstellung ist es bekannt, proteinhaltiges Sojaschrot in einer Wasserlösung mit einem pH-Wert von bis zu 9,0 auszukochen. Hierbei geht ein Teil der Proteine in Lösung, ein beachtlicher Rest verbleibt jedoch in dem Sojaschrot.

Aus "Die Nahrung" (1975, 19, 8, Seiten 687 - 688) ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Gewinnung von Ölen und Proteinen aus pflanzlichen Rohstoffen bekannt, bei dem eine Feinstzerkleinerung der pflanzlichen Rohstoffe durch Ultraschallgeräte bzw. Hochfrequenzzerkleinerungsaggregate erfolgen soll. Die Feinstzerkleinerung der pflanzlichen Rohstoffe dient dabei aber ausschl., wie dem Wortlaut des Artikels "Trends bei der Verarbeitung von Ölsamen und -früchten. Die gleichzeitige Gewinnung von Ölen und Proteinen" zu entnehmen ist, dem Aspekt der Zellzerstörung. Auf diese Weise wird das Extrahieren der Öle und Proteine aus dem pflanzlichen Rohmaterialien erleichtert bzw. erst ermöglicht.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art derart weiterzubilden, daß verschiedene proteinhaltige Substanzen als Eingangsstoffe Verwendung finden können, insbesondere daß das bekannte Nebenprodukt der Stärkeproduktion aus Kartoffeln aufbereitet werden kann, ohne daß Hydrolyseschäden an dem Verfahrensprodukt auftreten.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz bei Zimmertemperatur und unter Homogenisation erfolgt, wobei die durch die Homogenisation eingebrachte Wärmeenergie gleichzeitig wieder entzogen wird, und daß das alkalische Lösungsmittel einen pH-Wert größer als 11,5 aufweist und/oder der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz unter der Anwesenheit eines Detergents, insbesondere

von Natriumdodecylsulfat (SDS), erfolgt. Überraschenderweise stellt sich heraus, daß sich eine Vielzahl ansonsten nicht dispergierbarer, proteinhaltiger Substanzen in dem stark alkalischen Lösungsmittel bei Zimmertemperatur aufschließbar sind, wobei trotz des hohen pH-Werts von mehr als 11,5 keine nennenswerte Hydrolyseschäden auftreten. Vielmehr weisen die aufgeschlossenen Proteine auch bei einer koagulierten Ausgangssubstanz eine nativen Proteinen vergleichbare Struktur auf. Bei dem Aufschluß gehen vorwiegend die in der Substanz enthaltenen Proteine in Lösung, so daß unlösliche Bestandteile leicht abzutrennen sind. Dies kann beispielsweise durch Zentrifugieren oder eine geeignete Filtertechnik durchgeführt werden. Häufig mag auch eine weitergehende Aufbereitung, d. h. Reinigung der Lösung von Begleitstoffen sinnvoll sein. Das Neutralisieren und Entsalzen der alkalischen Lösung führt zu einem hochwertigen, geschmacksneutralen Endprodukt. Durch die Homogenisation der Mischung aus proteinhaltiger Substanz und dem alkalischen Lösungsmittel wird der Aufschluß der Proteine extrem beschleunigt. Dies garantiert die Möglichkeit zur großtechnischen Realisierung des neuen Verfahrens. Die durch die Homogenisation in die Mischung eingebrachte Energie ist der Mischung, beispielsweise unter Zuhilfenahme eines Wärmetauschers wieder zu entziehen. In jedem Fall muß ein Erwärmern der Mischung über Zimmertemperatur hinaus unterbunden werden, um der Hydrolyse der Proteine keinen Vorschub zu leisten.

Das alkalische Lösungsmittel muß entweder einen pH-Wert größer als 11,5 aufweisen und/oder der Aufschluß muß in Gegenwart eines Detergens erfolgen. In Verbindung mit der Homogenisation des Gemisches aus Lösungsmittel und proteinhaltiger Substanz hat sich ein pH-Wert von ca. 11,5 als besonders vorteilhaft beim Aufschluß der Proteine herausgestellt. Als besonders gut geeignetes Detergens erweist sich Natriumdodecylsulfat (SDS). Es kann mit Hilfe

von Kaliumsalzen leicht ausgefällt und auf diese Weise von den Proteinen entfernt werden. Im Prinzip sind auch andere Detergenzien, sofern sie vom Protein wieder abtrennbar sind, verwendbar. Der Einsatz der Detergenzien ermöglicht den Aufschluß beispielsweise von bei der Tofuherstellung und der Ölgewinnung aus Pflanzen anfallenden Schrotten schon bei Zimmertemperatur und einem pH-Wert von weniger als 10. Die hierzu notwendige Menge SDS kann bis auf einen unschädlichen Rest problemlos mit Kaliumsalzen ausgefällt werden.

Das alkalische Lösungsmittel kann eine Alkohollösung sein. Alkohollösungen als alkalische Lösungsmittel sind zur kostengünstigen Durchführung des neuen Verfahrens besonders geeignet.

Die Homogenisation kann mittels Ultraschall oder Hochdruckdesintegration erfolgen. Homogenisation mittels Ultraschall wird bislang im wesentlichen im Labormaßstab durchgeführt. Hochdruckdesintegration ist beispielsweise aus der Milchhomogenisierung bekannt. Hier stehen bereits entsprechende Geräte zur Verfügung, die auch für das neue Verfahren verwendbar sind.

Die in der Lösung befindlichen Proteine können durch Ultrafiltration aufkonzentriert werden und die Lösung kann durch Diafiltration entsalzt werden. Die bekannte Ultrafiltration zum Aufkonzentrieren der Lösung gestattet eine erneute Verwendung des abgefilterten Lösungsmittels und verringert die Wärmeenergie, die bei der Trocknung der Proteine zugeführt werden muß. Die Diafiltration zum Entsalzen der Lösung ist insbesondere insofern vorteilhaft, als daß es sich um ein mechanisches Verfahren handelt, also kein erneuter Einsatz von Chemikalien erforderlich ist. Außerdem ist mit der Diafiltration eine weitergehende Aufbereitung, d. h. Reinigung der Lösung verbunden. Die

Ausslußgrenze bei der Diafiltration liegt vorteilhaft bei 10.000 Dalton.

Von der proteinhaltigen Substanz können vor deren Aufschließen organoleptische Verbindungen, insbesondere Glycoalkaloide und Lipide durch saure Extraktion und anschließende Heißfiltration abgetrennt werden. Dieser Verfahrensschritt ist insbesondere zur Entfernung des Solanins aus kartoffelproteinhaltigen Substanzen sinnvoll. Für den Umfang der notwendigerweise einzusetzenden Chemikalien stellt es sich als günstig heraus, die saure Extraktion an der mechanisch zerkleinerten, aber noch nicht aufgeschlossenen Substanz durchzuführen. Unter Aspekten der Lebensmitteleignung ist insbesondere die Verwendung einer Mischung aus Ethanol und Eisessig für die saure Extraktion sinnvoll. Prinzipiell konnten jedoch auch andere Alkohole eingesetzt werden.

Die proteinhaltige Substanz kann vor dem Aufschließen mit Hexan entfettet werden. Dieser zusätzliche Verfahrensschritt ist vorwiegend bei der Aufarbeitung von Gluten angezeigt. Eine Extraktionsbehandlung mit Alkoholen ist bei Gluten hingegen nicht angebracht, da Gluten alkohollösliche Proteine enthält.

Die proteinhaltige Substanz kann zu Beginn des Aufschlusses sauer aufgenommen werden. Das saure Aufnehmen der proteinhaltigen Substanz hat sich insbesondere bei der Aufarbeitung von Gluten als sinnvolle und den Aufschluß beschleunigende Maßnahme herausgestellt.

Der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz kann unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd erfolgen. Die Verwendung von Wasserstoffperoxyd am Aufschluß der proteinhaltigen Substanz ermöglicht die pH-Fällung der aufgeschlossenen Proteine, was ihr Aufkonzentrieren vor der Trocknung

erleichtert. Weiterhin wirkt sich das Wasserstoffperoxid in einer helleren Färbung und einem langkettigeren Aufbau der gewonnenen lebensmittelfähigen Proteine aus.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiel 1:

Bei der Stärkegewinnung aus Kartoffeln angefallene verunreinigte Kartoffelproteine mit einem Anteil von 80 bis 85 % Proteinen, 8 bis 10 % lipidartigen Verbindungen und 1 bis 2 % Mineralstoffen sowie bis zu 0,12 % Solanin werden durch Vermahlen mechanisch zerkleinert. Anschließend wird das verunreinigte Kartoffelprotein mit einer Mischung aus 98 Volumenprozent Ethanol und 2 Volumenprozent Eisessig versetzt. Die Einsatzmenge der Mischung aus Ethanol und Eisessig beträgt dabei 3 - 5 l je kg verunreinigtes Kartoffelprotein. Anschließend wird das verunreinigte Kartoffelprotein 20 Minuten unter Rückfluß und ständigem Umrühren in der Mischung aus Ethanol und Eisessig gekocht. Die Kochtemperatur beträgt ca. 80 °C. Nach dem Kochen wird der Sud heiß filtriert und der Rückstand erneut mit 3 - 5 l der Mischung aus Ethanol und Eisessig je kg aufgenommen und unter Rückfluß und Umrühren 20 Minuten gekocht. Je nach dem Eingangsgehalt und dem gewünschten Endgehalt des Glycoalkaloids Solanin kann dieser Vorgang noch mehrfach wiederholt werden. Sobald die Extraktion beendet ist, wird der Rückstand entweder direkt weiterverarbeitet oder zur Zwischenlagerung eingetrocknet.

Nun wird der das Kartoffelprotein enthaltene Rückstand in eine 50%ige Ethanollösung eingerührt, wobei ein Hochdruckdesintegrator im Bypass zu dem Mischungsbehälter betrieben wird. Hierbei entfallen auf jedes kg Rückstand bis zu 20 l Lösungsmittel. Dem Lösungsmittel ist 30%iges Wasserstoffperoxyd so zugegeben, daß dessen Konzentration

9

einem zweifachen molaren Überschuß an Cystein entspricht. Nach Zugabe von bis zu 0,2 mol Alkali je kg Überstand wird kontinuierlich weiteres Wasserstoffperoxyd zugesetzt. Insgesamt werden zwischen 50 und 100 ml 30%iges Wasserstoffperoxyd je kg aufzuschließendem Überstand hinzugegeben. Während der gesamten Zeit wird homogenisiert. Der gesamte Aufschluß des kartoffelproteinhaltigen Rückstands nimmt etwa 30 Minuten in Anspruch.

Anschließend wird die im Aufschluß gewonnene Lösung bei ca. 4.500 xg zwei Minuten zentrifugiert um unlösliche Bestandteile des verunreinigten Kartoffelproteins abzutrennen. Das Aufkonzentrieren der Lösung erfolgt mittels Ultrafiltration, wobei eine Membran mit einer Ausschlußgrenze kleiner als 10.000 Dalton Verwendung findet. Bei der Aufkonzentration der Lösung werden ca. 70 % des Ausgangsvolumens entfernt.

Nach Neutralisation der aufkonzentrierten Lösung wird diese durch Diafiltration entsalzt und gereinigt. Im letzten Verfahrensschritt wird das Kartoffelprotein durch Sprühgetrocknung der verbleibenden Lösung gewonnen. Für das getrocknete Kartoffelprotein ergibt sich eine Zusammensetzung aus 89 bis 93 % Protein ( $N \times 6,25$ ), 3 bis 5 % Asche, ca. 0,4 % Fett und weniger als 0,01 % Solanin. Dieser Solanineinhalt liegt unter demjenigen einer geschälten Kartoffel von 0,012 % der Trockensubstanz. Der Trockensubstanzanteil der sprühgetrockneten Kartoffelproteine beträgt 92 bis 95 %.

#### Beispiel 2:

Gluten wird mit Hexan einer Extraktion unterworfen und anschließend heiß filtriert. Hierbei erfolgt eine weitgehende Entfettung des Glutens.

Der Aufschluß des Glutens erfolgt in einer 50%igen Ethanollösung bei gleichzeitiger Homogenisation des Gemisches

10

durch Ultraschall. Der pH-Wert des Lösungsmittels wird zu Beginn auf 5,5 eingestellt und dort für 10 Minuten gehalten. Anschließend wird wie beim Beispiel 1 das Alkali hinzugegeben. Der alkalische Aufschluß des Glutens nimmt 20 Minuten in Anspruch. Die Reinigung der im Aufschluß gewonnenen Lösung, deren Aufkonzentration, Entsalzung und Diafiltration sowie die Trocknung des Proteins erfolgt wie beim Beispiel 1.

**Beispiel 3:**

Schrote der Ölgewinnung wie z. B. aus den Pflanzen Soja und Raps werden nach mechanischer Zerkleinerung direkt in verdünnter Natronlauge aufgeschlossen. Hierbei beträgt der pH-Wert der Natronlauge 12,5, sofern die Mischung aus den zerkleinerten Schoten und der Natronlauge während des Aufschlusses homogenisiert wird. Erfolgt ausschließlich ein Umrühren der Mischung, sollte eine 0,1 normale Natronlauge mit einem pH-Wert von 13 Anwendung finden. In diesem Fall nimmt der Aufschluß dennoch mehrere Stunden in Anspruch. Bei Homogenisation der Mischung sind nur einige Minuten erforderlich.

Die im Aufschluß gewonnene Lösung wird analog zu Beispiel 1 weiterbehandelt, um die Proteine in lebensmittelfähiger Form zu isolieren.

**Beispiel 4:**

Der Aufschluß der bei der Ölgewinnung aus Pflanzen anfallenden proteinhaltigen Schrote oder anderer schwer aufschließbarer proteinhaltiger Substanzen erfolgt alternativ zu Beispiel 3 unter Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS). 0,1 normaler Natronlauge als Lösungsmittel werden 1 % SDS hinzugegeben. Wird der Aufschluß der zerkleinerten Schrote in dem Lösungsmittel unter Homogenisation mittels Ultraschall vollzogen, kann die Alkalimenge je nach Schrot bis unter einen pH-Wert von 10 abgesenkt werden. Nach 30 Minuten wird mit 4.500 xg zentrifugiert und der Überstand

11

abdekantiert. Dem Überstand wird soviel Kaliumsalz zugesetzt, daß die Kaliumkonzentration dem 3fachen molaren Überschuß, bezogen auf das eingesetzte Natriumdodecylsulfat (SDS) entspricht. Nach 15 Minuten Röhren tritt ein Niederschlag auf, der mit 4.500 xg abzentrifugiert wird. Auf diese Weise lassen sich 95 bis 98 % des eingesetzten SDS entfernen. Die verbleibende SDS-Konzentration liegt unterhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC). Der nach dem Entfernen des SDS verbleibende Überstand wird mittels Ultrafiltration unter Verwendung von Membranen mit einer Ausschlußgrenze kleiner als 10.000 Dalton aufkonzentriert, neutralisiert und mittels Diafiltration entsalzt. Die Diafiltration entfernt hierbei auch die nach der Fällung mit Kaliumsalz in der Lösung verbliebenen SDS Reste.

A2

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung von lebensmittelfähigen Proteinen aus einer proteinhaltigen Substanz, wobei eine Lösung durch Aufschluß der proteinhaltigen Substanz in einem alkalischen Lösungsmittel gewonnen wird, wobei unlösliche Bestandteile der Substanz von der Lösung abgetrennt werden, wobei die Lösung nach Neutralisation entsalzt wird und wobei die in der Lösung enthaltenen Proteine aufkonzentriert und durch Trocknung isoliert werden, dadurch gekennzeichnet, daß der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz bei Zimmertemperatur und unter Homogenisation erfolgt, wobei die durch die Homogenisation eingebrachte Wärmeenergie gleichzeitig wieder entzogen wird, und daß das alkalische Lösungsmittel einen pH-Wert größer als 11,5 aufweist und/oder der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz unter Anwesenheit eines Detergents, insbesondere von Natriumdodecylsulfat (SDS), erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das alkalische Lösungsmittel einen pH-Wert von ca. 12,5 aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Natriumdodecylsulfat (SDS) nach dem Aufschluß mit Kaliumsalzen ausgefällt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das alkalische Lösungsmittel eine Alkohollösung ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Homogenisation mittels Ultraschall oder Hochdruckdesintegration erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Lösung befindlichen Proteine

13

durch Ultrafiltration aufkonzentriert werden und daß die Lösung durch Diafiltration entsalzt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß von der proteinhaltigen Substanz vor deren Aufschließen organoleptische Verbindungen, insbesondere Glycoalkaloide und Lipide, durch saure Extraktion, insbesondere mit Ethanol und Eisessig, und anschließende Heißfiltration abgetrennt werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die proteinhaltige Substanz vor deren Aufschließen durch Extraktion mit Hexan entfettet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die proteinhaltige Substanz zu Beginn des Aufschlusses sauer aufgenommen wird.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd erfolgt.

## GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 8. Februar 1993 (08.02.93) eingegangen,  
ursprüngliche Ansprüche 1-10 durch geänderte Ansprüche 1-8 ersetzt (2 Seiten)]

1. Verfahren zur Gewinnung von lebensmittelfähigen Proteinen aus einer proteinhaltigen Substanz, wobei eine Lösung durch Aufschluß der proteinhaltigen Substanz in einem alkalischen Lösungsmittel und unter Homogenisation erfolgt, wobei die durch die Homogenisation eingebrachte Wärmeenergie gleichzeitig wieder entzogen wird, wobei das alkalische Lösungsmittel einen pH-Wert größer als 11,5, insbesondere von ca. 12,5 aufweist und/oder der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz unter Anwesenheit eines Detergents, insbesondere von Natriumdodecylsulfat (SDS), erfolgt, gewonnen wird, wobei unlösliche Bestandteile der Substanz von der Lösung abgetrennt werden, wobei die Lösung nach Neutralisation entsalzt wird und wobei die in der Lösung enthaltenen Proteine aufkonzentriert und durch Trocknung isoliert werden, dadurch gekennzeichnet, daß der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz bei Zimmertemperatur und die Homogenisation mittels Hochdruckdesintegration erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Natriumdodecylsulfat (SDS) nach dem Aufschluß mit Kaliumsalzen ausgefällt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das alkalische Lösungsmittel eine Alkohollösung ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Lösung befindlichen Proteine durch Ultrafiltration aufkonzentriert werden und daß die Lösung durch Diafiltration entsalzt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß von der proteinhaltigen Substanz vor deren Aufschließen organoleptische Verbindungen, insbesondere Glycoalkaloide und Lipide, durch saure Extraktion,

insbesondere mit Ethanol und Eisessig, und anschließende Heißfiltration abgetrennt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die proteinhaltige Substanz vor deren Aufschließen durch Extraktion mit Hexan entfettet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die proteinhaltige Substanz zu Beginn des Aufschlusses sauer aufgenommen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Aufschluß der proteinhaltigen Substanz unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd erfolgt.

**IN ARTIKEL 19 GENANNTE ERKLÄRUNG**

US 4,624,805 discloses a process for recovering food grade protein from agricultural commodities. This process comprises all steps which are cited in the preamble of the new claim 1.

The disadvantage of the known process is that the sonication used for enhancing the protein extraction is not usable while carrying out the process at an industrial scale. Further the temperature of the extraction of less than 130° F which corresponds to 55 °C still results in damages of the recovered proteins caused by the alkali. But the lowest temperature of 100° F which corresponds to 37,8 °C mentioned in the examples of US 4,624,805 is necessary to solve at least a main part of the proteins during sonication.

It is an object of the invention to replace the sonication during the protein extraction by a more effective method of enhancing the extraction.

WO 91/12730 is concerned with this object, too. It is disclosing an enhanced process for recovering food grade protein based on US 4,624,805. Instead of sonification attrition milling is used for reaching the desired level of extraction of the protein. But attrition milling is a cost intensive and a slow method also.

The invention solves the problems of the known processes by high pressure desintegration. This method is usable on an industrial scale at low costs. It is also very effective in enhancing the protein extraction so that the extraction can be carried out at the room temperature within 30 minutes or less and still more protein is recovered than by using the known processes.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/EP92/02313
---

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. Cl. <sup>5</sup> : A23J 1/16; A23J 1/12; A23J 1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. <sup>5</sup> : A23J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US, A, 4 624 805 (J.T. LAWHON) 25 November 1986,  see claims 1,3,5-7, 11; 12, 15, 17 see column 2, lines 31-66 see column 3, line 67 - column 5, line 34 see table 1  ---	1,2,4-6 8-10
Y	WO, A, 9 112 730 (ENERGENETICS INC.) 5 September 1991 see page 10, line 15 - page 11, line 10; claims 1,7-11 see page 11, line 24 - page 12, line 25 see examples 1,2  ---	8
Y	INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET AGRICOLES 1977, pages 1197-1217 T. STARON: 'Une Méthode d'Obtention des Protéines Végétales pour l'Alimentation Humaine et Animale' see page 1197, right-hand column, paragraph 5 -page 1198, left-hand column, paragraph 3 see page 1198, right-hand column, paragraph 6 -paragraph 17	10

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 9 December 1992 (09.12.92)	Date of mailing of the international search report 25 January 1993 (25.01.93)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Faxsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP92/02313

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	see figures 1-4 --- BE, A, 571 734 (C.C.D. PROCESSES LTD.) 3 April 1959, see claims 1,2,4,11. see page 4, lines 26-49 see page 6, line 45 - page 8, line 15 ---	9 5
A	J. AGRIC. FOOD CHEM., Vol. 28, No.3, 1980, WASHINGTON, US pages 529-532 A. ESEN see page 529, right-hand column ---	1
A	US, A, 4 919 952 (G.T. SADARANGANEY) 24 April 1990, see claims 1,3,5,6,8 see column 3, line 41 - column 5, line 47 see examples 1,2 -----	1,6,10

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9202313**  
**SA 65295**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 09/12/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-4624805	25-11-86	None		
WO-A-9112730	05-09-91	AU-A-	7469991	18-09-91
BE-A-571734		None		
US-A-4919952	24-04-90	None		

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 92/02313

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)<sup>6</sup>

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC  
 Int.Kl. 5 A23J1/16; A23J1/12; A23J1/14

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff<sup>7</sup>

Klassifikationssystem	Klassifikationsymbole
Int.Kl. 5	A23J

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup>

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>

Art. <sup>10</sup>	Kenntzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	US,A,4 624 805 (J.T. LAWHON) 25. November 1986	1,2,4-6
Y	siehe Ansprüche 1,3,5-7,11,12,15,17 siehe Spalte 2, Zeile 31 - Zeile 66 siehe Spalte 3, Zeile 67 - Spalte 5, Zeile 34 siehe Tabelle 1 ---	8-10
Y	WO,A,9 112 730 (ENERGETICS INC.) 5. September 1991 siehe Seite 10, Zeile 15 - Seite 11, Zeile 10; Ansprüche 1,7-11 siehe Seite 11, Zeile 24 - Seite 12, Zeile 25 siehe Beispiele 1,2 ---	8 -/-

<sup>6</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann sinnvoll ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

## IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  09.DEZEMBER 1992	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  25.01.93
Internationale Recherchenbehörde  EUROPAISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten  VUILLAMY V.M.L.

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		Betr. Anspruch Nr.
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	
Y	INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET AGRICOLES 1977, Seiten 1197 - 1217 T. STARON : 'Une Méthode d'Obtention des Protéines Végétales pour l'Alimentation Humaine et Animale' siehe Seite 1197, rechte Spalte, Absatz 5 - Seite 1198, linke Spalte, Absatz 3 siehe Seite 1198, rechte Spalte, Absatz 6 -Absatz 17 siehe Abbildungen 1-4 ---	10
Y	BE,A,571 734 (C.C.D. PROCESSES LTD.) 3. April 1959	9
A	siehe Ansprüche 1,2,4,11 siehe Seite 4, Zeile 26 - Zeile 49 siehe Seite 6, Zeile 45 - Seite 8, Zeile 15 ---	5
A	J. AGRIC. FOOD CHEM., Bd. 28, Nr. 3, 1980, WASHINGTON, US Seiten 529 - 532 A. ESEN siehe Seite 529, rechte Spalte ---	1
A	US,A,4 919 952 (G.T. SADARANGANEY) 24. April 1990 siehe Ansprüche 1,3,5,6,8 siehe Spalte 3, Zeile 41 - Spalte 5, Zeile 47 siehe Beispiele 1,2 -----	1,6,10

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9202313  
SA 65295

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

09/12/92

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4624805	25-11-86	Keine	
WO-A-9112730	05-09-91	AU-A- 7469991	18-09-91
BE-A-571734		Keine	
US-A-4919952	24-04-90	Keine	